

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

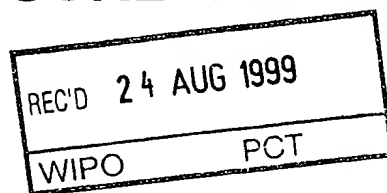
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RG PCT/DE 99/01541 5
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



DE 99/1541

Bescheinigung

09/701334

Die Jenapharm GmbH & Co KG in Jena/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Pharmazeutische Präparate zur Regulierung der Insulin-Freiset-
zung durch Beeinflussung der β -Zelle der pankreatischen Inseln"

am 28. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
A 61 K 31/40 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayr

Aktenzeichen: 198 23 829.0



.....
**Pharmazeutische Präparate zur Regulierung der
Insulin-Freisetzung durch Beeinflussung der β -Zelle der pankreati-
schen Inseln**
.....

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur Regulierung der Insulin-Freisetzung durch Beeinflussung der β -Zelle der pankreatischen Inseln über einen Melatonin-spezifischen Rezeptor.

Es wurde überraschend festgestellt, daß Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate in ihrer erfindungsgemäßen Verwendung

- ihren Insulin-senkenden Einfluß über membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren realisieren;
- über den Melatonin-Rezeptor Zeitgeber-Bedeutung besitzen, da die Insulin-Freisetzung isolierter pankreatischer Inseln circadianen und ultradianen Rhythmen unterliegt;
- über den Melatonin-Rezeptor in pharmakologischen ($5\mu\text{M}$) als auch physiologischen Dosen ($0,2\text{nM}$) die stimulierte Insulin-Freisetzung pankreatischer Inseln statistisch signifikant senken.

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur Regulierung der Insulin-Freisetzung durch Beeinflussung der β -Zelle der pankreatischen Inseln über einen Melatonin-spezifischen Rezeptor.

10 Das Indolamin Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) ist ein Hormon des Pinealorgans, das ebenfalls in der Retina, der HARDERSchen Drüse von Rodentia und auch den enterochromaffinen Zellen nachgewiesen wurde. Es wird u.a. zwecks Abhilfe bei Schlaflosigkeit (sedative Bedeutung), Minderung von Problemen infolge Jet lag bei Interkontinentalflügen, Synchronisationsproblemen infolge kurzzeitigen Arbeitszeitwechsels (shift work), Zellschutz vor freien Radikalen (besonders Hydroxylradikalen), Verlangsamung von Tumorwachstum und Katarakt-Prävention und darüber hinaus zur Lebensverlängerung eingesetzt (Pang SF et al., Recent development of pineal melatonin and its receptors in humans. In: Tang PL et al., (eds.), Melatonin: A Universal Photoperiodic Signal with Diverse Actions, Front Horm Res 21: 133-146, 1996).

25 Melatonin spielt eine ganz entscheidende Rolle bei der Regulation circadianer Rhythmen. Beispielsweise synchronisiert es den freilaufenden Schlaf-Wach-Zyklus Erblindeter. Photisch gesteuerter nervaler Einfluß (Katecholamin-Einfluß) wird in der Epiphyse in ein hormonelles Signal (Melatonin) umgesetzt. Die Epiphyse fungiert als neuroendokriner 'Übersetzer' und informiert mit nächtlich erhöhter Melatoninausschüttung über das Verhältnis von Licht- und Dunkelzeit im Tagesverlauf (Uhrenfunktion) sowie dessen Veränderungen im Jahresverlauf (Kalenderfunktion).

30 Die Steuerung circadianer Rhythmen erfolgt bei Säugetieren - im Gegensatz zu Vögeln - jedoch nicht direkt in der Epiphyse, sondern in einem hypothalamischen Kerngebiet, dem Nuclei suprachiasmatici (NSC). Diese Kerne spielen als primärer „circadian pacemaker“ bei der Generierung von circadianen Rhythmen der Säugetiere die entscheidende Rolle (Reuss S, Com-

nents and connections of the circadian timing system in mammals, *Cell Tissue Res*: 285, 353-378, 1996).

- Von besonderer Bedeutung für das Verständnis funktioneller Interaktionen zwischen diesem hypothalamischen Kern und der Epiphyse war der Nachweis von Melatonin-Rezeptoren im NSC, die auf eine funktionelle Wechselwirkung der beiden Strukturen hinweisen (Cassone, VM, Melatonin and suprachiasmatic nucleus. In: Klein DC et al., (eds), *Suprachiasmatic nucleus, The mind's clock*, Oxford University Press 1991, 309-323).
- Daß die Dichte der Melatonin-Rezeptoren im NSC neben einer Vielzahl anderer Funktionsmerkmale am Tage erhöht ist, während im Gegensatz dazu physiologische, biochemische und morphologische Untersuchungen eine Aktivitätserhöhung der Epiphyse während der Nacht belegen, ist mit einem inhibitorischen Melatonin-Einfluß auf den NSC als zeitbezogenes, feinregulatorisches Instrumentarium vereinbar.
- (Weaver, DR et al., Localization of melatonin receptors in mammalian brain. In: Klein DC (eds), *Suprachiasmatic nucleus, The mind's clock*, Oxford University Press 1991, 289-308).
- Neben dem NSC wurden Melatonin-Rezeptoren jedoch auch in der Pars tuberalis (Williams, LM; Morgan PJ, Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat, *J Endocrinol* 119: R1-R3, 1988); (Morgan PJ et al., Melatonin receptors in the ovine pars tuberalis: Characterization and autoradiographical localization, *J Neuroendocrinol* 1: 1-4, 1989), der Retina (Tosini G; Menaker M, Circadian rhythms in cultured mammalian retina, *Science* 272: 419-421, (1996), dem Kleinhirn (Fauteck, JD et al., The adult human cerebellum is a target of the neuroendocrine system involved in the circadian timing, *Neurosci Lett* 179: 60-64, 1994) und in jüngerer Zeit auch in peripheren Geweben und Organen wie Magen, Niere, Lunge, Herz, Hoden u.a. beschrieben (Pang, SF et al., Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research, *Biol Signals* 2: 177-180, 1993); (Morgan, PJ et al., Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance, *Neurochem Int* 24: 101-146, 1994).

35

Die Möglichkeit der Insulin-Freisetzung über Melatonin-Rezeptoren im Pankreas, den Langerhansschen Inseln oder der insulinproduzierenden B-Zelle zu beeinflussen wurde bisher nicht beschrieben.

- 5 Zur Zeit sind unterschiedliche Melatoninrezeptor-Subtypen wie beispielsweise Mel_{1a}, Mel_{1b} und Mel_{1c} bekannt, deren Aminosäuresequenz und Membranstruktur (7 Transmembrane-Helices) analysiert wurden (Reppert SM et al., Melatonin receptors step into the light: Cloning and classification of subtypes, TIPS 17: 100-102, 1996).
- 10 Es handelt sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G_{i/o}-gekoppelt), die durch Pertussistoxin (Pertussistoxin-sensitives G-Protein) blockiert werden. Unter Zugrundelegung dieser Zusammenhänge beruhen funktionelle Melatonin-Rezeptornachweise u.a. auf der Möglichkeit, die Melatonin-bedingte Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP-Erhöhung durch Pertussistoxin einzuschränken oder aufzuheben (Carlson LL., Weaver DR. and Reppert SM, Melatonin signal transduction in hamster brain: Inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein, Endocrinology 125: 2670-2676, 1989); (Carlson LL et al., Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary, J
- 15 Neuroendocrinol 7: 361-369, 1995).
- Zusammenfassend ist feststellen, daß bei Säugetieren die Melatonin-induzierte Hemmung der Adenylatzyklase über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein erfolgt.
- 20
- 25 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, pharmazeutische Präparate zur Regulierung der Insulin-Freisetzung durch Beeinflussung der β -Zelle der pankreatischen Inseln über spezifische Rezeptoren zu finden.
- 30 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate zur Herstellung pharmazeutischer Präparate verwendet werden, die die Regulierung der Insulin-Freisetzung durch Beeinflussung der β -Zelle der pankreatischen Inseln über einen Melatonin-spezifischen Rezeptor gewährleisten.

35

Es wurde überraschend festgestellt, daß

- Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate ihren Insulin-senkenden Einfluß über membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren realisieren;
- 5 - Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate über den Melatonin-Rezeptor Zeitgeber-Bedeutung besitzen, da die Insulin-Freisetzung isolierter pankreatischer Inseln circadianen und ultradianen Rhythmen unterliegt;
- Melatonin und/oder dessen chemisch modifizierte Derivate über den
- 10 Melatonin-Rezeptor in pharmakologischen ($5\mu\text{M}$) als auch physiologischen Dosen ($0,2\text{nM}$) die stimulierte Insulin-Freisetzung pankreatischer Inseln statistisch signifikant senken.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate zur oralen und parenteralen, incl. topischen, rektalen, subcutanen, intravenösen, intramuskulären, intraperitonealen, intranasalen, intravaginalen, intrabukkalen oder sublingualen Applikation, die neben üblichen Träger- und Verdünnungsmitteln eine in dem Anspruch 1 aufgezeigte Verbindung als Wirkstoff enthalten.

- 20 Als pharmazeutische Formulierungen können zur Anwendung kommen:
- Tablette, Kapseln oder Dragees von 0,01 bis 200 mg Wirkstoff, oral,
 - Ampullen von 0,01 bis 200 mg Wirkstoff als subkutane Injektion,
 - Pflaster mit transdermaler Freisetzung von 0,01 bis 200 mg Wirkstoff,
 - 25 - subkutane Implantate mit Freisetzungskapazität von 0,01 bis 200 mg-Wirkstoff,
 - Gele und Cremes mit transdermaler Freisetzung von 0,01 bis 200 mg Wirkstoff,
 - bukkal applizierbare Systeme mit einer Freisetzung von 0,01 bis
 - 30 200 mg Wirkstoff.

Die Arzneimittel der Erfindung werden mit den üblichen festen oder flüssigen Trägerstoffen oder Verdünnungsmitteln und den üblicherweise verwendeten pharmazeutisch-technischen Hilfsstoffen entsprechend der

35 gewünschten Applikationsart mit einer geeigneten Dosierung in bekannter Weise hergestellt.

Funktioneller Nachweis membranständiger Melatonin-Rezeptoren an der pankreatischen Insel

Abb. 1 zeigt die graphische Darstellung der statistisch signifikanten Senkung von Glukose- bzw. KCl- stimulierter Insulinsekretion durch Melatonin (MT, hier 5 μ M) - Nährflüssigkeit mit Glukose bzw. KCl + Melatonin = dunkle Säulen - im Vergleich zur Kontrolle - Nährflüssigkeit mit Glukose bzw. KCl = helle Säulen.
Die Ergebnisse sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.001$ statistisch signifikant.

Abb. 2 zeigt den Einfluß von Melatonin (hier 10 nM Melatonin) auf die Forskolin-stimulierte Insulinfreisetzung, die durch steigende Konzentration von Forskolin stimuliert wurde..
Der Insulin-senkende Einfluß von Melatonin ist signifikant.

Aus beiden Abbildungen ist ersichtlich, daß Melatonin sowohl in physiologischen als auch in pharmakologischen Dosen die KCl-, Glukose- sowie Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senkt. Dies ist auf eine Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und/oder der Adenylatcyclase zurückzuführen ist. Ferner konnte in phase-response-Untersuchungen nachgewiesen werden, daß Melatonin als Zeitgeber eingesetzt zu Phasenbeschleunigungen der circadianen Insulinsekretion führt.

Patentansprüche

1. Verwendung von Melatonin und/oder dessen chemisch
5 modifizierte Derivate zur Herstellung pharmazeutischer
Präparate zur Regulierung der Insulin-Freisetzung durch
Beeinflussung der β -Zelle der pankreatischen Inseln über einen
Melatonin-spezifischen Rezeptor.

10

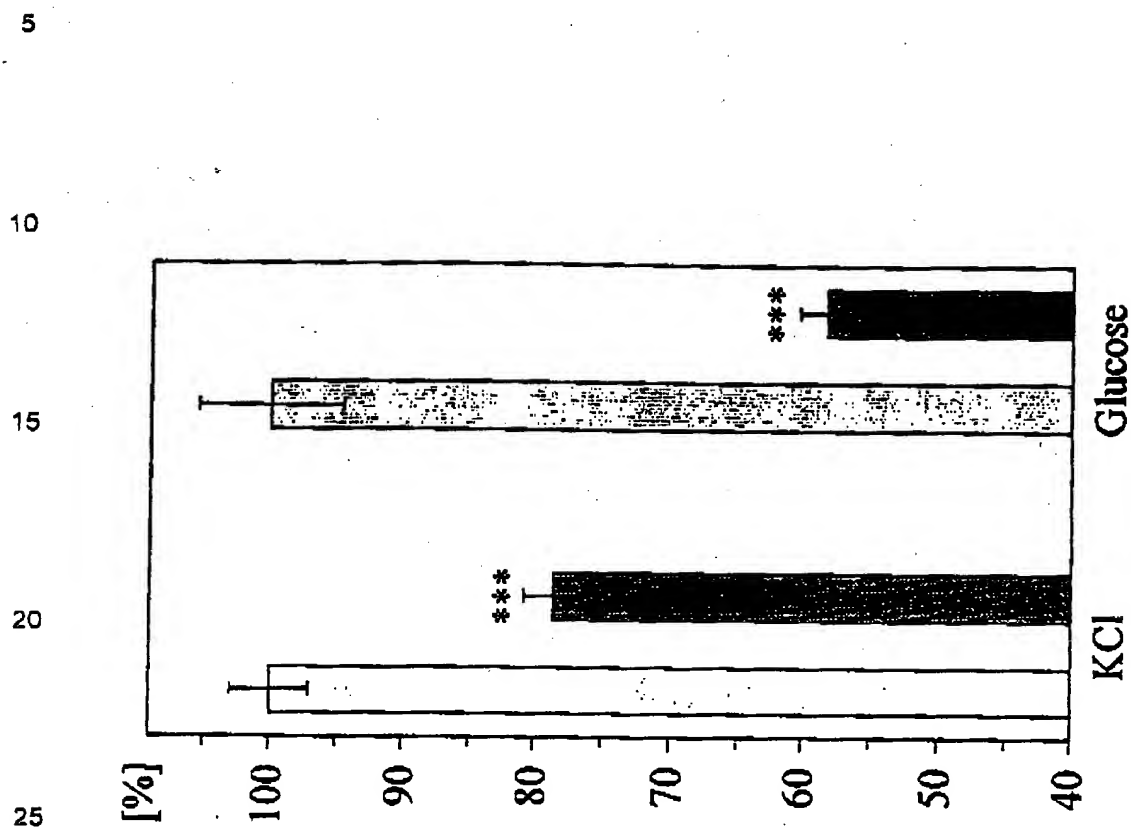


Abb. 1

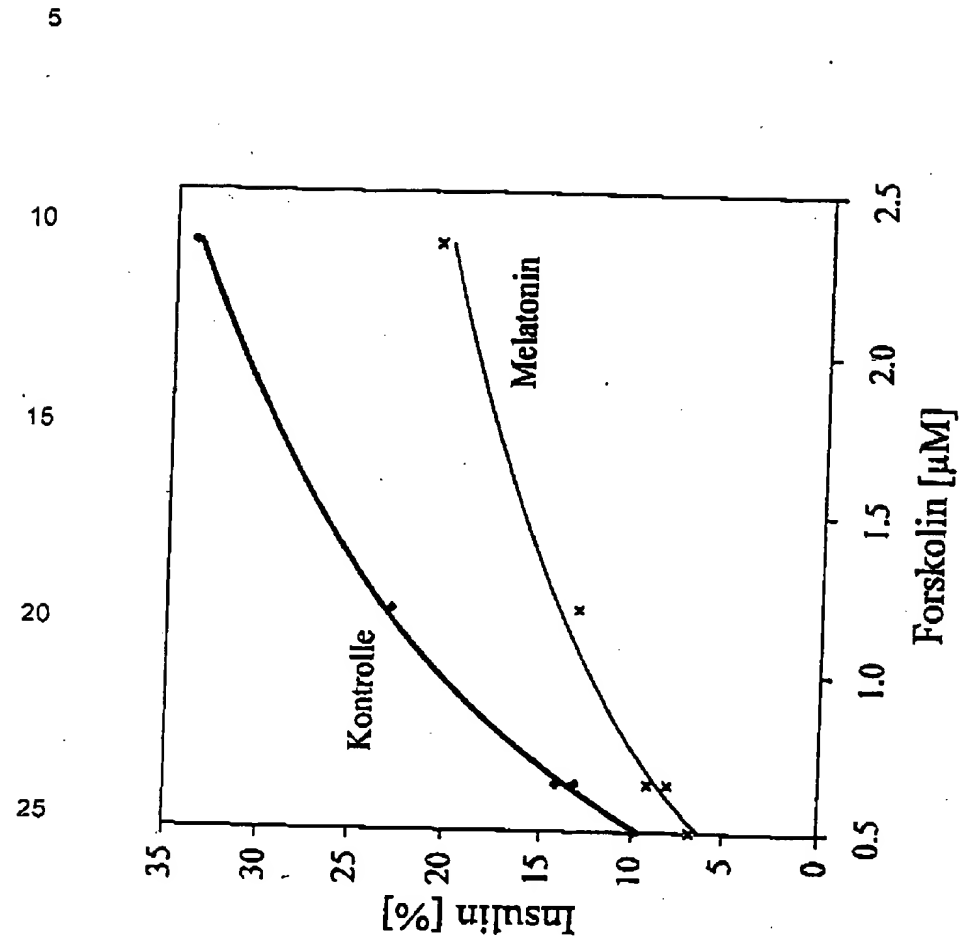
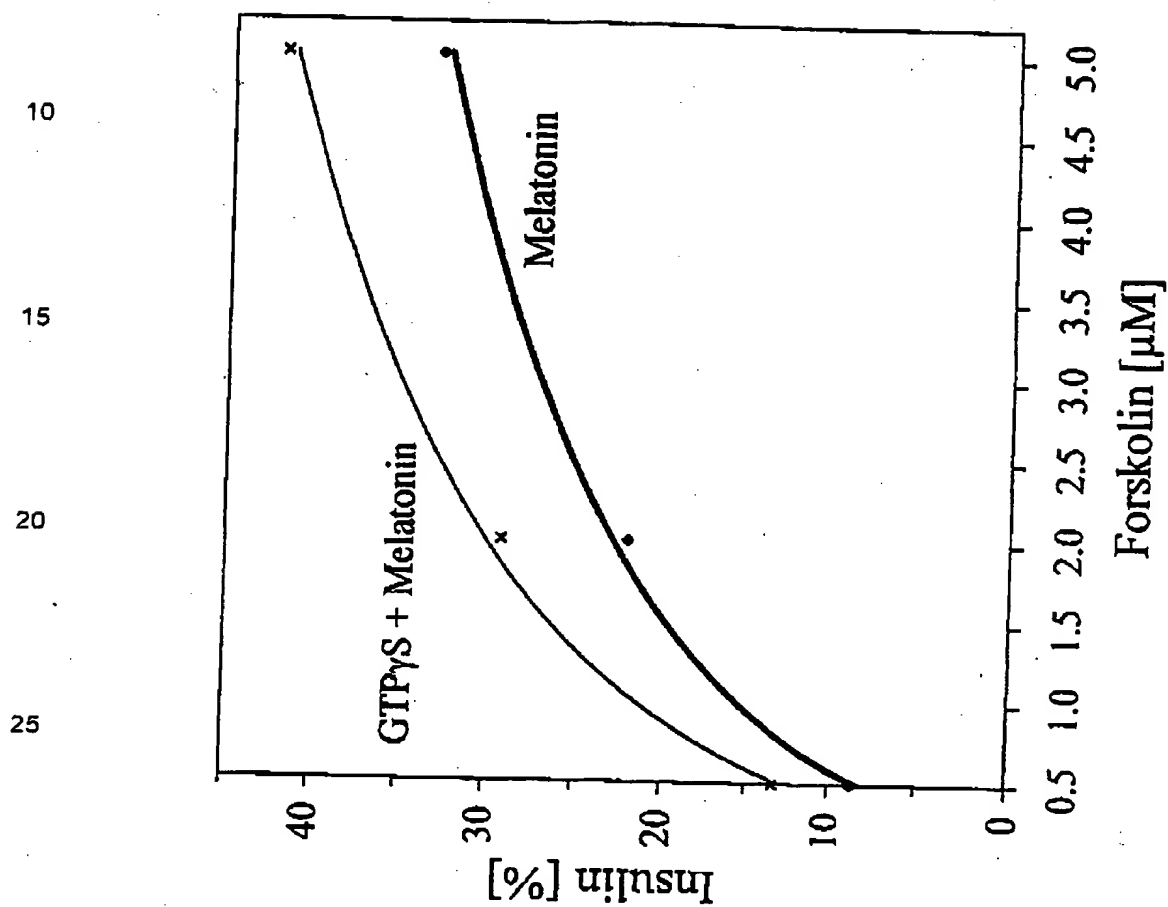


Abb. 2

Funktioneller Nachweis membranständiger Melatonin-Rezeptoren an der pankreatischen Insel mittels Einsatz von GTP γ S (Guanosin-S-[gamma-thio]triphosphat)

- 5 Abb. 3 zeigt den Einfluß von nicht hydrolisierbarem GTP γ S auf die Melatoninwirkung.
- Es ist aus dem Vergleich der Daten zur Melatonin- + Forskolin-versetzten Nährlösung mit einer Lösung, bestehend aus der Melatonin- + Forskolin-versetzten Nährlösung + GTP γ S, ersichtlich, daß die Melatoninwirkung auf die Forskolin-stimulierte Insulin-Freisetzung durch
- 10 GTP γ S nahezu aufgehoben wird. Ursache dafür ist die funktionelle Blockade der Melatonin-Rezeptoren durch GTP γ S.
- Diese Ergebnisse können als direkter Nachweis zur rezeptorspezifischen Regulierung der Insulin-Freisetzung gewertet werden und es wird
- 15 somit erstmalig ein funktioneller Melatoninrezeptor-Nachweis an der LANGERHANSschen Insel geführt.

5



10

15

20

25

30

35

Abb. 3

Autoradiographischer Nachweis membranständiger Melatonin-Rezeptoren an der pankreatischen Insel mittels $2^{[125J]}$ Jod-melatonin

Abb. 4 zeigen autoradiographische Untersuchungen zum Nachweis von Melatonin-Rezeptoren auf pankreatischem Gewebe (Gefrierschnitt) neonater Ratten.

Die punktförmigen Signale repräsentieren Bindungsplätze von $2^{[125J]}$ Jodmelatonin auf dem Gefrierschnitt.

Die zugehörigen Kontrollen zeigen keine punktförmigen Signale.

Zur genauen Lokalisation werden die entwickelten Filmplatten allein sowie nach Mikromanipulation gezeigt, bei denen die über dem Gewebe montierten Filmplatten mitphotographiert wurden (Insert-Balken: 400 μm).

Abb. 5 stellt die Quantifizierung des autoradiographischen Nachweises als Verdrängungskurve von $2^{[125J]}$ Jodmelatonin aus seinen Rezeptorbindungen durch nichtjodiertes Melatonin dar.

Die Untersuchung erfolgte mittels computergestützter Grauwertanalyse (Optimas 2.0).

20

Diese Ergebnisse können als direkter Nachweis von Melatonin-spezifischen Rezeptoren in der LANGERHANSschen Insel gewertet werden.

5

10

15

20

25

30

35

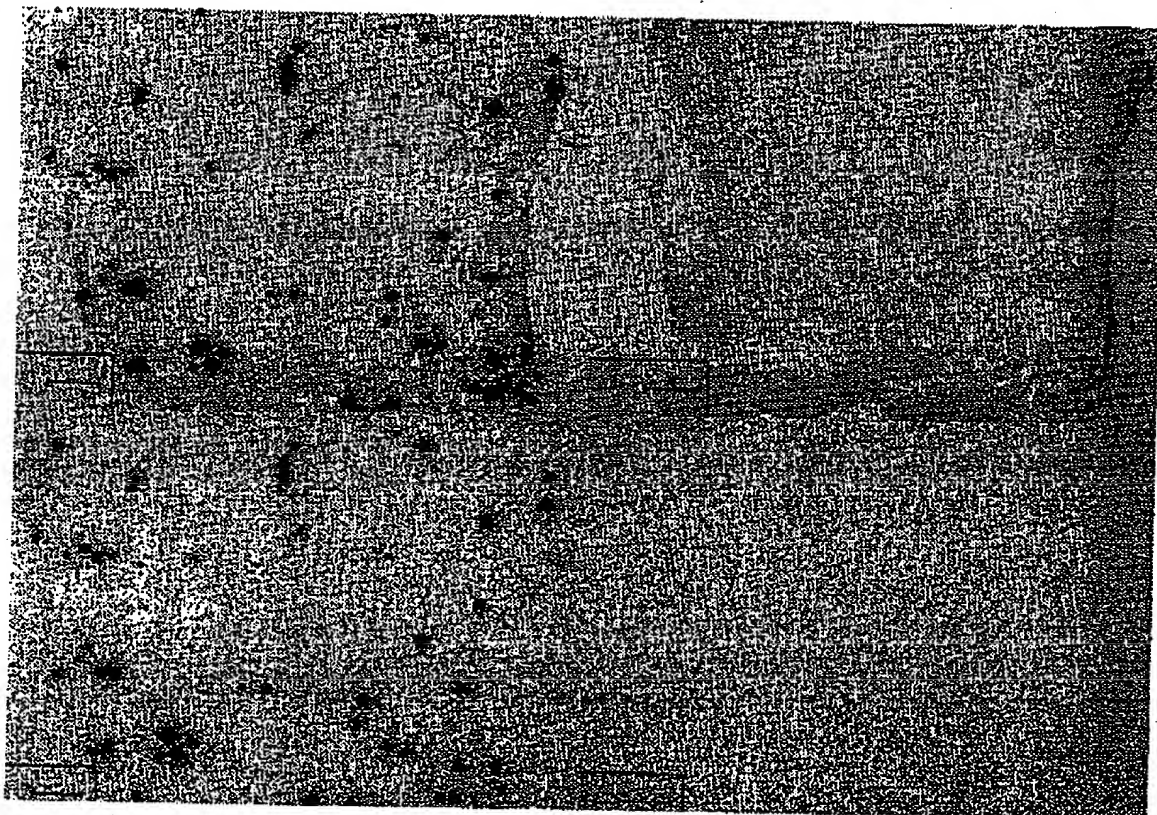


Abb. 4

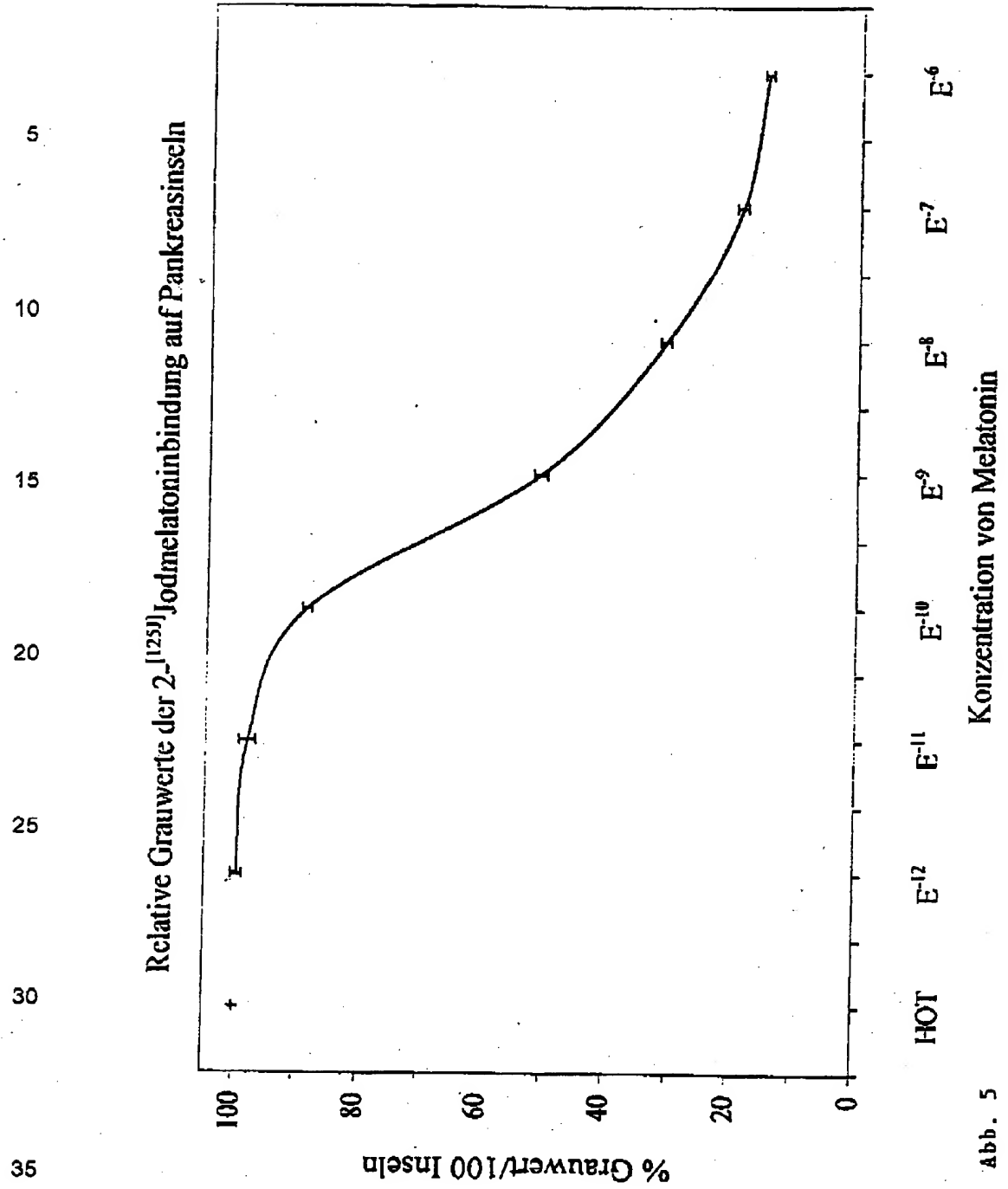


Abb. 5

Molekularbiologischer Nachweis membranständiger Melatonin-Rezeptoren an der pankreatischen Insel

Abb. 6 zeigt das amplifizierte PCR-Produkt, welches eine Länge von 329 bp besitzt und eine spezifische Teilsequenz der Melatonin-Rezeptor-Sequenz darstellt.

Somit kann auf molekularer Ebene der Nachweis für Melatonin-Rezeptoren in der LANGERHANSschen Insel erstmals ebracht werden.

10 Nachfolgend ist die genaue Methodik des molekulabiologischen Nachweises aufgezeigt.

1. Präparation des Pankreas-Gewebe

15 Das für die molekulabiologische Untersuchung eingesetzte Pankreas-gewebe wurde von 8 neonatalen Ratten (männlich und weiblich) gewonnen und bis zur weiteren Untersuchung bei -70 °C gelagert.

2. RNA-Extraktion

20 Es wurde aus 150 mg Pankreasgewebe nach einer Guanidinthiocyanat/LiCl-Methode nach Cathala et al., A method of isolation of intact translationally active ribonucleic acid, DNA: 329-335, 1983, die Gesamt-RNA isoliert.

Die Reinheits- und Mengenbestimmung der isolierten RNA erfolgte durch photometrische Absorptionsmessung.

25 Die Menge der isolierten RNA betrug 150 µg.
Der Quotient der optischen dichten (O.D.) von 260 nm und 280 nm betrug 1.7.

3. Erstellung einer cDNA-Bibliothek mittels reverse Transkriptase-Reaktion (RT)

Bei der RT-Reaktion wird mRNA in komplementäre DNA (copy DNA, cDNA) revers transkribiert, die dann als Ausgangsmatrize für die anschließende Amplifikation dient ('PCR-Reaktion').

35 Die cDNA-Synthese wurde nach den Angaben des Herstellers des entsprechenden 'Kits' durchgeführt (Pharmacia-Biotech). Es wurden 5 µg RNA als Matrize für die RT-Reaktion eingesetzt.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 60 min.

4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der molekularbiologische Nachweis der Transkriptionsprodukte für den Mel_{1A}-Rezeptor erfolgte unter Anwendung der PCR-Technik.

Dazu wurden Teilsequenzen der cDNA-Moleküle der Melatonin-Rezeptoren mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidsequenzen ('Primer') amplifiziert.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf konventionellen Agarose-Gelen detektiert.

Bei der Konstruktion der Primer wurden Länge (Basenpaare) und Basenzusammensetzung (G/C-Gehalt) der Primer sowie Länge der PCR-Produkte nach den erforderlichen Regeln beachtet.

Die Primer waren spezifisch für ein partielles cDNA-Fragment des Melatonin-Rezeptors der Ratte nach Reppert et al., Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses, Neuron 13: 1177-1185, 1994; vergl. Accession-No.: U14409.

Die Position der Primer umfassten die cDNA-Regionen 11-33 (up-primer) und 319-339 (low-primer). Das spezifische PCR-Produkt sollte eine Länge von 329 bp besitzen.

Die PCR-Bedingungen waren: 94 °C (1 min) - 55 °C (1 min) - 72 °C (1 min), abschließend 15 min bei 72 °C.

Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch in einem 2.5%igen Agarose-Gel (plus Ethidumbromid) untersucht. Als Längenmaßstab wurde ein 100 bp-DNA-Standard verwendet.

Die Laufzeit betrug 90 min bei 50 V in einem Standard-Elektrophoresepuffer.

15

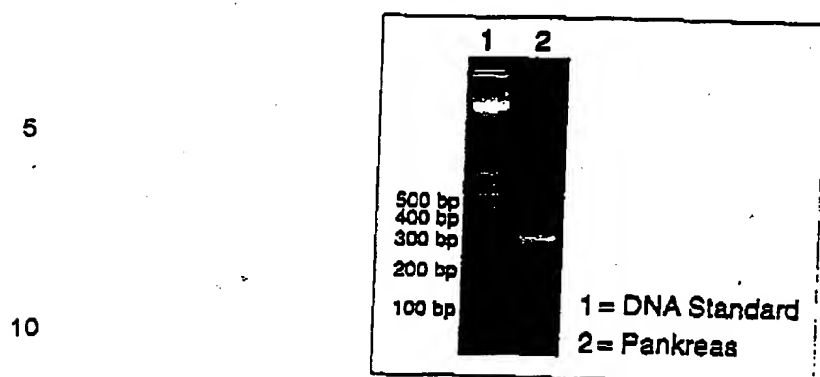


Abb. 6.

THIS PAGE BLANK (USPTO)